第29卷 第3期　　昆 虫 学 报　　Vol. 29, No. 3
1986 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1986

蓖麻蚕和家蚕中的谷胱甘肽及正丁基高半胱氨酸亚砜亚胺对它的抑制作用

高济宗　许廷森
(中国科学院上海生物化学研究所)

摘要　本文利用乙醛酸排除昆虫中比较高的游离半胱氨酸的干扰,用 5, 5′-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB) 方法测定了蓖麻蚕、家蚕中还原谷胱甘肽的含量及其组织分布,观察到脂肪体、后部丝腺、中肠等均含有非常丰富的谷胱甘肽 (GSH),说明谷胱甘肽在昆虫氨基酸的代谢调节控制中起着重要的作用。蓖麻蚕和家蚕中, GSH 含量及分布有所区别。五龄中期注射 S-正丁基高半胱氨酸亚砜亚胺 (BSO) 引起家蚕脂肪体 GSH 含量明显降低,提示蚕 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶受 BSO 强烈抑制;五龄后期,可能由于合成酶活力及 GSH 周转率均处于较低水平,未观察到 GSH 含量有明显下降。

关键词　蓖麻蚕　家蚕　谷胱甘肽　正丁基高半胱氨酸亚砜亚胺

谷胱甘肽 (L-γ-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸 (GSH)) 广泛分布在动物、植物细胞以及微生物中,且含量极其丰富,在细胞中浓度达 0.5—1.0mM, 远高于半胱氨酸、胱氨酸及 γ-谷氨酰半胱氨酸。因此,细胞中的半胱氨酸似乎以谷胱甘肽的形式贮存。这个三肽具有许多重要的生理功能,它涉及到蛋白质和 DNA 的合成、运输,酶的活性,代谢, 细胞的保护,以及外来毒物的解毒。谷胱甘肽借助于本身的还原作用,利用本身与过氧化氢、各种过氧化物、游离基的反应,保护细胞膜及许多蛋白质,维持其必需的 SH 基团, 并通过"γ-谷氨酰循环"中存在于细胞膜上的 γ-谷氨酰转肽酶, 提供了氨基酸在细胞之间运转的一种极好途径 (Meister 等, 1976; 1983)。

在昆虫中,除在解毒机制中的作用外, 有关 GSH 在它们体内的含量、分布, 以及在代谢中的作用报道很少。为了今后进一步研究 GSH 在昆虫体内代谢中的作用, 作者最近以蓖麻蚕和家蚕为材料,采用乙醛酸使之与体内游离的半胱氨酸结合,用 5, 5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 方法测定了还原谷胱甘肽的含量及其分布, 并注射 S-正丁基高半胱氨酸亚砜亚胺 (BSO) 以了解 GSH 本身在蚕体内的代谢。

材 料 和 方 法

1. 蚕品种　家蚕: 东肥×华合及浙农 1 × 苏 12,由浙江嘉兴市农校提供;蓖麻蚕;白黄,由广州石牌蚕种场提供。家蚕及蓖麻蚕自四龄眠起,于 25℃ 温室饲养。

2. 试剂　GSH、乙醛酸系美国 Sigma 公司出品, LBSO 系美国康奈尔大学医学院生化系 Meister 教授赠送, DTNB 系瑞士 Fluka 公司出品。

本文于 1984 年 10 月收到。
本文承沈昭文教授审阅文稿,谢作军同志协助养蚕及解剖,在此一并致谢。

3. BSO 处理 五龄三天及五天家蚕（浙农 1 × 苏 12），实验组及对照组均为雌雄各半，实验组 BSO 处理剂量为每头蚕 10 微升生理盐水，含 L-BSO 1.5 毫克，用微量注射器注射于蚕第 7 腹节侧面；对照组仅注射 10 微升生理盐水，2—4 小时后解剖，取出脂肪体及中肠供测定 GSH 用。

4. 样品制备 在冷却条件下小心解剖家蚕及蓖麻蚕，取出各组织及体液，并保存于干冰中待测；用于脂肪体、中肠、丝腺、体液测定的蚕每批一般为 10—20 条，马氏管一般为 100 条。

5. GSH 测定 脂肪体、中肠、丝腺、马氏管用 0.1 mol/L pH7.2 Tris-HCl 缓冲液按 1:3 的比例（W/V）在冰浴中用聚四氟乙烯杆的玻璃匀浆器匀浆 2 分钟（马达带动），然后离心 10 分钟（15,000rpm），取上清液 1 毫升，用 1 毫升 H_2O 稀释，加入 3.2% 磺基水杨酸 3 毫升沉淀蛋白（放在冰浴中，以防止 GSH 氧化），体液直接取 1 毫升，1:1 稀释后用磺基水杨酸按上述处理，在 15,000rpm 离心 10 分钟；以上各组织经磺基水杨酸处理后各取上清液 2 毫升，加 1 毫升含抗坏血酸及乙醛酸的磷酸钾缓冲液 1.0 mol/L pH6.8（每 100 毫升含 0.25 克抗坏血酸，0.75 克乙醛酸），60℃ 加热 5 分钟后，迅速放入冰浴冷却，然后在室温下平衡，加 0.3 毫升 3.8mM 浓度 DTNB 1.0mol/L pH6.8 磷酸钾缓冲液，7 分钟后在上海分析仪器厂产 751G 型分光光度计上用 412 毫微米波长读数。

结 果 与 讨 论

1. GSH 测定的方法 虽然测定 GSH 有着许多方法，但是 Ellman（1959）用 DTNB 测定 SH 基团的方法自六十年代以来一直被广泛应用，如 Duron 等（1963）；Kaplan 等（1964）；Roberts 等（1971）；Naoto 等（1972）；Orfanos 等（1980）。但是由于昆虫中游离氨基酸浓度很高（Florkin 等，1974），较人血液氨基酸含量高 50 到 300 倍（Chen，1977），为了避免半胱氨酸对 GSH 测定的干扰，提高 GSH 测定的精确性，本文

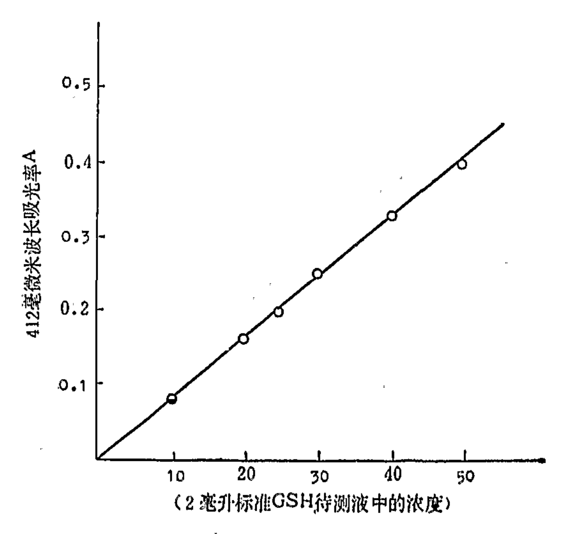


图 1 在含乙醛酸的系统中用 DTNB 测定 GSH 的定量关系

⊖ 加有半胱氨酸（750μM）

作者参考 Ball (1966) 及 Jackson (1969) 的方法，用乙醛酸与半胱氨酸反应生成四氢噻唑 2,4-二羧酸的原理对昆虫中的游离半胱氨酸加以屏蔽，并加以改进。

用不同浓度的标准还原谷胱甘肽，利用上述方法（即加有乙醛酸），其测定结果与 Ellman(1959) 方法相比，克分子消光系数为 13,500，与 13,600 相比仅低 7.4‰，GSH 浓度与 412 毫微米波长吸光率 A 呈线性关系，加有 75 倍 GSH 浓度的半胱氨酸，由于乙醛酸的存在，通过生成稳定的四氢噻唑 2,4-二羧酸，并不影响对 GSH 的测定(见图 1)。

本文采用磺基水杨酸沉淀蛋白，从而使蛋白沉淀过程中 GSH 的氧化减少到很小程度(Woodward 等,1932)。由于标准曲线是在与样品测试相同条件下获得的，因此测试样品中 GSH 在 60℃,5 分钟保温引起氧化所造成的误差可相应消除。

2. 蓖麻蚕和家蚕 含量及其在各组织中的分布(表 1)。

表 1 蓖麻蚕和家蚕谷胱甘肽的含量及分布

	GSH 含量(微克分子/克组织，体液为每毫升)				
	脂肪体	中肠	后部丝腺	马氏管	体液
蓖麻蚕	1.14±0.09	1.59±0.11	0.669±0.071	0.229±0.050	0.019±0.004
家蚕	1.14±0.06	0.580±0.043	0.652±0.090	0.144±0.020	0.026±0.003

蓖麻蚕品种：白黄，五龄四天；家蚕品种：东肥×华合，五龄五天；以上数据系三次以上测定的平均值及标准差。

从表 1 可见，蚕脂肪体、后部丝腺，中肠均含有相当高的还原谷胱甘肽，按克组织计算达 0.50—1.60 微克分子范围，与小白鼠含量高的肝脏和肾脏（分别为 8.01 和 3.68 微克分子/克组织 (Griffith, 1980)相比，虽低些，但仍落在已知动物、植物、微生物的水平 (0.5—10.0) 内。蓖麻蚕与家蚕，虽然同属鳞翅目昆虫，但前者属于天蚕蛾科，后者属于家蚕蛾科，它们的 GSH 含量及分布也有所不同。蓖麻蚕中肠、马氏管 GSH 含量高于家蚕，家蚕体液中 GSH 浓度高于蓖麻蚕。蓖麻蚕中，中肠含量最高，依次是脂肪体及后部丝腺，马氏管也有相当的含量，但家蚕中脂肪体 GSH 含量最高，丝腺第二，中肠第三，马氏管含量较蓖麻蚕低得多。由于生物体内 GSSG 浓度远低于 GSH (Wendell, 1970)，因此，还原谷胱甘肽的含量一定程度上反映了总的谷胱甘肽的水平。

昆虫的脂肪体在代谢中起着极为重要的作用 (Price, 1973)，而马氏管则起着排泄代谢产物、调节体内水分以及氨基酸等的再吸收的功能。中肠是昆虫食物消化吸收的重要器官，食物中的游离氨基酸以及食物蛋白质分解后的各种氨基酸都要经由中肠吸收到体液中去，然后加以转运，丝腺含有许多与氨基酸代谢有关的酶，特别是与甘氨酸、丙氨酸合成有关的酶系，因此，必然要涉及到氨基酸在细胞中的转运、吸收，谷胱甘肽作为 γ-谷氨酰转肽酶的底物，在氨基酶的转运中起着至关重要的作用，从我们获得的结果来看，脂肪体、中肠、丝腺等组织含有非常丰富的 GSH 是与这些组织所起的生理作用相吻合的。

邹柏祥等(1986)曾观察到 γ-谷氨酰转肽酶广泛分布在蓖麻蚕的中肠、马氏管、后部丝腺、脂肪体等组织，且以马氏管，中肠为最大，五龄期间，该酶活力峰与体液中氨基酸浓度变化相一致，脂肪体和丝腺中该酶的变化与它们中间的转氨酶系活力变化相对应，说明

作为 γ-谷氨酰转肽酶底物的 GSH 在蚕氨基酸吸收、转运中起着重要的作用。

昆虫的酰胺酶对昆虫体内的药物、毒物代谢起着重要作用，蚕脂肪体、中肠中的酰胺酶受到对-氯汞苯甲酸强烈抑制表明巯基是至关重要的(林浩等，1980)，由于 GSH 能维持体内一些活性蛋白的巯基，使之免遭氧化，因此，昆虫体内含量丰富的 GSH 也起着类似哺乳动物中的解毒作用。

3. 注射 BSO 对脂肪体及中肠 GSH 含量的影响　五龄三天注射 BSO 于家蚕，2 小时后解剖，观察到处理组脂肪体 GSH 含量较对照组显著降低，处理组仅为对照组 67.4%，中肠也有所下降，处理组为对照组的 90.3%(见表 2)。

表 2　五龄三天 BSO 对家蚕脂肪体及中肠 GSH 含量的影响

	GSH 含量(微克分子/克组织)		
	对照组	处理组	处理组/对照组
脂肪体	0.913±0.031	0.615±0.018	67.4%
中　肠	0.557±0.011	0.503±0.009	90.3%

我们知道 BSO 对于哺乳动物 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶是一个强烈的抑制剂，注射 BSO 于小白鼠，引起 GSH 含量的急剧下降，这表明 GSH 在小白鼠体内的周转很快，GSH 在"γ-谷氨酰循环"中的利用率很高；当注射 γ-谷氨酰转肽酶的抑制剂时，由于 GSH 的利用被阻断，血液中 GSH 含量较对照组明显升高 (Griffith, 1979)。从我们注射 BSO 的结果可见，蚕体内 GSH 的代谢也相当活跃，它对整个机体的氨基酸吸收、运转、代谢必然起着很重要的作用。

五龄五天注射 BSO 于家蚕，4 小时后解剖，测定脂肪体 GSH 含量，处理组较对照组下降不明显，仅下降 4.2%(见表 3)。

表 3　五龄五天 BSO 对家蚕脂肪体 GSH 含量的影响*

	GSH 含量(微克分子/克组织)		
	对照组	处理组	处理组/对照组
脂肪体	0.660±0.087	0.632±0.034	95.8%

* 家蚕品种：浙农 1×苏12，L-BSO 结构式为：
以上数据系三次测定的平均值及标准差。

```
      (CH2)3CH3
         |
   O ═ S ═ NH
         |
   H — C — H
         |
   H — C — H
         |
   H — C — NH3+
         |
        COO-
```

而五龄三天注射则下降 32.6%。五龄五天注射与五龄三天注射所引起的不同结果有可能由于五龄中期(三天)正值蚕丝蛋白合成和氨基酸代谢的旺盛时期，GSH 的周转率也

比较快，而五龄后期丝蛋白的合成和氨基酸代谢已趋低下，因此，五龄中期积累的 GSH 的周转率比较低。以上结果说明 BSO 对蚕 GSH 合成有很大影响，其作用的酶系极可能与蚕中 γ-谷氨酰半胱氨酸合成有关。

从蓖麻蚕、家蚕体内的 GSH 含量和组织分布以及 BSO 注射对 GSH 含量的影响来看，昆虫中谷胱甘肽以及极可能存在的"γ-谷氨酰循环"或类似的模式，它们在涉及到氨基酸的吸收、转运、酶活性的维持、外来氧化物及毒物的解毒等等方面起很重要的作用，这方面的工作正在进一步深入研究中。

参 考 文 献

邹柏祥等 1986 蓖麻蚕 γ-谷氨酰转肽酶的研究。昆虫学报 **29**(1): 16—24。

林浩等 1980 柞蚕细胞色素 P-450 和酰胺酶的研究。昆虫学报 **23**: 341—9。

Ball, C. R. 1966 Estimation and identification of taiols in rat spleen after cysteine or glutathone treatment: relevance *Pharmacol*. **15**: 809—16.

Chen, P. S. 1977 Analysis of amino acids, peptides and related compounds. In: Analytical Biochemistry of Insects (ed. Turner, R. B.) p. 131—69. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.

Duron, B. O. and B. M. Kelly, 1963 Improved method for determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* **61**: 882—8.

Ellman, G. L. 1959 Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70—7.

Florkin, M. et al. 1974 Hemolymph: Composition. In: The Physiology of Insecta (ed. Rockstein, M.) Vol. V, p. 291—7. Academic Press, New York and London.

Griffith, O. W. 1980 Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106 207—12.

Griffith, O. W. and A. Meister, 1979 Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 5606—10.

Jackson, R. C. 1969 Studies in the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.* **111**: 309—15.

Kaplan, J. C. and J. C. Dreyfus, 1964 Determination of erythrocyte glutathione with a nitrated aromatic disulfide, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**: 5—6.

Meister, A. and S. S. Tate 1976 Glutathione and related γ-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 559—604.

Meister, A. and M. E. Anderson, 1983 Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711—60.

Naoto, K. and H. Yoshiyuki, 1972 Determination of blood glutathione (GSH, GSSG) by DTNB [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] and glutathione reductase. *Igaku To Seibutsugaku* 85: 269—74.

Orfanos, A. P. et al. 1980 Ultramicromethod for estimation of total glutathione in dried blood spots on filter paper. *Anal. Biochem.* **104**: 70—4.

Price, G. M. 1973 Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biol. Rev.* **48**: 333—75.

Roberts, J. and N. S. Agar, 1971 An improved method for the automated analysis of erythrocyte reduced glutathione. *Clin. Chim. Acta* **34**: 475—80.

Wendell, P. L. 1970 Measurement of oxidized glutathione and total glutathone in the perfused rat heart. *Biochem. J.* **117**: 661—5.

Woodward, G. E. and E. G. Fry, 1932 The determination of blood glutathione. *J. Biol. Chem.* **97**: 465—82.

GLUTATHIONE IN *PHILOSAMIA CYNTHIA* AND *BOMBYX MORI* AND ITS INHIBITION BY BSO

Gao Ji-zong Xu Ting-sen
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The amounts of reduced glutathione (GSH) and its distribution in different tissues of *Philosamia cynthia ricini* and *Bombyx mori* were determined with the DTNB method after removing free cysteine with glyoxylic acid. It was found that large amounts of GSH were present in the fat body, silk gland and midgut, suggesting the important role of GSH in the regulation of amino acid metabolism in these two insects. However, the level and distribution of GSH in *Philosamia* were different from that in *Bombyx*. During the middle stage of the fifth instar the injection of S-n-butylhomocystine (BSO) would markedly decrease the level of GSH in *Bombyx*, presumably due to the inhibition of γ-glutamylcysteine synthetase by BSO. But in later fifth instar no decrease in the amount of GSH was detected because of the lower activity of the γ-glutamylcysteine synthetase and slow turnover of GSH.

Key words *Philosamia cynthis ricini*——*Bombyx mori* —— *glutathione* —— S-n-butyl homocysteine sulfoxifide